

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-269997

(P2005-269997A)

(43) 公開日 平成17年10月6日(2005.10.6)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/00	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2004-88705 (P2004-88705)	(71) 出願人	801000050
(22) 出願日	平成16年3月25日 (2004. 3. 25)		財団法人くまもとテクノ産業財団
			熊本県上益城郡益城町大字田原2081番地10
		(74) 代理人	110000109
			特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	前田 寧
			熊本県熊本市帯山5-9-23
		Fターム(参考)	4B024 AA01 CA02 DA02 DA03 EA02
			FA06 FA10 GA11 HA17
			4C084 AA13 NA14 ZA941 ZC801
			4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14
			ZA94 ZC80

(54) 【発明の名称】 アデノウイルスベクターの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 アデノウイルスベクターを高効率で産生する方法を提供すること。

【解決手段】 (1) パッケージングと増幅に必要なアデノウイルスゲノムと導入遺伝子カセットとからなるベクターDNAと、(2) 5' リガンド蛋白質(TPC)、アデノウイルスの5' 逆方向末端反復のカセット(ITR)、5' loxP部位、切り出し可能なパッケージングシグナルカセット、3' loxP部位、E1領域の全部もしくは一部が欠失している以外はE2領域、E4領域及び後期遺伝子を含むアデノウイルスゲノムと、アデノウイルスの3' ITRカセット、3' のTPCとを含むヘルパーアデノウイルスDNAとを、哺乳動物細胞にコトランスフェクションする工程、並びにレスキュー及びプロパゲーションを繰り返して継代培養する工程を含む、アデノウイルスのパッケージングに不可欠なアデノウイルスゲノムとそれに続く導入遺伝子カセットを含むゲノムが内部にパッケージングされてなるカプシド蛋白を含むアデノウイルスベクターの製造方法。

【選択図】 なし

**METHOD FOR PRODUCING ADENOVIRUS VECTOR**

**Publication number:** JP2005269997 (A)

**Publication date:** 2005-10-06

**Inventor(s):** MAEDA YASUSHI

**Applicant(s):** KUMAMOTO TECH & IND FOUND

**Classification:**

- international: C12N15/09; A61K35/76; A61K48/00; A61P21/00; C12N15/09; A61K35/66; A61K48/00; A61P21/00; (IPC1-7): C12N15/09; A61K35/76; A61K48/00; A61P21/00

- European:

**Application number:** JP20040088705 20040325

**Priority number(s):** JP20040088705 20040325

**Abstract of JP 2005269997 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for producing an adenovirus vector in high efficiency. ; **SOLUTION:** The method for producing the adenovirus vector containing a capsid protein obtained by packaging an adenovirus genome indispensable in packaging of the adenovirus, and a genome containing a transduction gene cassette following the adenovirus genome comprises a step of cotransfecting (1) a vector DNA comprising the adenovirus genome required for the packaging and amplification, and the transduction gene cassette, and (2) a helper adenovirus DNA containing the adenovirus genome containing a 5' ligand protein (TPC), a cassette of 5' inverse terminal repeat (ITR) of the adenovirus, a 5' loxP site, an excisable packaging signal cassette, a 3' loxP site, an E2 region except the deleted whole or part of an E1 region, an E4 region and a late gene, a 3' ITR cassette of the adenovirus, and TPC of 3', with a mammal cell; and a step of subcultivating the cotransfected product by repeating rescue and propagation. ; **COPYRIGHT:** (C)2006,JPO&NCIPI

---

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-269997

(P2005-269997A)

(43) 公開日 平成17年10月6日(2005.10.6)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/00	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2004-88705 (P2004-88705)	(71) 出願人	801000050
(22) 出願日	平成16年3月25日 (2004.3.25)		財団法人くまもとテクノ産業財団
			熊本県上益城郡益城町大字田原2081番地10
		(74) 代理人	110000109
			特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	前田 寧
			熊本県熊本市帯山5-9-23
		Fターム(参考)	4B024 AA01 CA02 DA02 DA03 EA02
			FA06 FA10 GA11 HA17
			4C084 AA13 NA14 ZA941 ZC801
			4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14
			ZA94 ZC80

(54) 【発明の名称】 アデノウイルスベクターの製造方法

## (57) 【要約】

【課題】 アデノウイルスベクターを高効率で産生する方法を提供すること。

【解決手段】 (1) パッケージングと増幅に必要なアデノウイルスゲノムと導入遺伝子カセットとからなるベクターDNAと、(2) 5' リガンド蛋白質(TPC)、アデノウイルスの5' 逆方向末端反復のカセット(ITR)、5' loxP部位、切り出し可能なパッケージングシグナルカセット、3' loxP部位、E1領域の全部もしくは一部が欠失している以外はE2領域、E4領域及び後期遺伝子を含むアデノウイルスゲノムと、アデノウイルスの3' ITRカセット、3' のTPCとを含むヘルパーアデノウイルスDNAとを、哺乳動物細胞にコトランスフェクションする工程、並びにレスキュー及びプロパゲーションを繰り返して継代培養する工程を含む、アデノウイルスのパッケージングに不可欠なアデノウイルスゲノムとそれに続く導入遺伝子カセットを含むゲノムが内部にパッケージングされてなるカプシド蛋白を含むアデノウイルスベクターの製造方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(1) パッケージングと増幅に必要なアデノウイルスゲノムと導入遺伝子カセットとからなるベクターDNAと、(2) 5' リガンド蛋白質(TPC)、アデノウイルスの5' 逆方向末端反復のカセット(ITR)、5' loxP部位、切り出し可能なパッケージングシグナルカセット、3' loxP部位、E1領域の全部もしくは一部が欠失している以外はE2領域、E4領域及び後期遺伝子を含むアデノウイルスゲノムと、アデノウイルスの3' ITRカセット、3' のTPCとを含むヘルパーアデノウイルスDNAとを、哺乳動物細胞にコトランスフェクションする工程、並びにレスキュー及びプロパゲーションを繰り返して継代培養する工程を含む、アデノウイルスのパッケージングに不可欠なアデノウイルスゲノムとそれに続く導入遺伝子カセットを含むゲノムが内部にパッケージングされてなるカプシド蛋白を含むアデノウイルスベクターの製造方法。

10

## 【請求項2】

(1) パッケージングと増幅に必要なアデノウイルスゲノムと導入遺伝子カセットとからなるベクターDNAと、(2) 5' リガンド蛋白質(TPC)、アデノウイルスの5' 逆方向末端反復のカセット(ITR)、パッケージングシグナルカセットとE1遺伝子の全部もしくは一部が欠失している以外はE2領域、E4領域及び後期遺伝子を含むアデノウイルスゲノム、3' ITRとを含むヘルパーアデノウイルスDNAとを、哺乳動物細胞にコトランスフェクションする工程、並びにレスキュー及びプロパゲーションを繰り返して継代培養する工程を含む、アデノウイルスのパッケージングに不可欠なアデノウイルスゲノムとそれに続く導入遺伝子カセットを含むゲノムが内部にパッケージングされてなるカプシド蛋白を含むアデノウイルスベクターの製造方法。

20

## 【請求項3】

哺乳動物細胞がCre293である、請求項1又は2に記載のアデノウイルスベクターの製造方法。

## 【請求項4】

導入遺伝子カセットが、筋ジストロフィー治療用遺伝子カセットである、請求項1から3の何れかに記載のアデノウイルスベクターの製造方法。

## 【請求項5】

コトランスフェクションを、リン酸カルシウムを用いる方法またはリポフェクション法により行う、請求項1から4の何れかに記載のアデノウイルスベクターの製造方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、遺伝子治療等に用いられるアデノウイルスベクターの製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

アデノウイルス(Ad)は約36kbのサイズの二本鎖直鎖状DNAと、その両末端に自身がコードする蛋白が共有結合している。このウイルスは、遺伝子導入効率が優れていることから特に治療用遺伝子導入用ベクターとしての研究が鋭意行われている。

40

ヒトアデノウイルスゲノムは、5'逆方向末端反復配列(ITR)、パッケージングシグナル(ψ)、初期領域E1AおよびE1Bからなる領域E1、領域E2、領域E3、領域E4、後期領域L1～L5、および3' ITRを含む。領域E1およびE4は調節タンパク質を含み、領域E2は複製に必要なタンパク質をコードし、L領域はウイルスの構造タンパク質をコードする。

## 【0003】

アデノウイルスは野生のままでは、ヒト細胞がウイルスの感染、増殖により損傷するため、遺伝子治療に用いるためには、ウイルスが増殖しないよう遺伝子の組換えが必要になる。アデノウイルス遺伝子組換えの検討の結果、特許文献1には、野生アデノウイルスゲノムからE1遺伝子の全部もしくは一部を欠失させる方法が報告されており、特許文献2

50

には、E1a-E1bの領域が存在しないが、複製またはパッケージングに必要なゲノムを含むアデノウイルスゲノムが報告されている。このように野生アデノウイルスの特定遺伝子を欠失させ、その後目的遺伝子を導入する手法は第一世代の方法と呼ばれている。この方法ではベクターを複製不完全とすることでは成功したが、動物実験の結果、ベクターが標的とする部位で炎症の発症を伴うことが分かった。

#### 【0004】

上記第一世代のアデノウイルスベクターの問題点を克服するために、例えば特許文献3に記載されているように、アデノウイルスの領域がベクターから除去され、トランスでヘルパーウイルスより提供されるヘルパーウイルスシステムが提案された（第二世代の方法）。このベクターは、パッケージングおよびレスキュー用にトランスで供給されるウイルス調節タンパク質および構造タンパク質の補足を必要とする。

10

#### 【0005】

上記第二世代の方法であるヘルパーウイルスシステムではヘルパーウイルスを用いる。このヘルパーウイルスの影響をなくすために、E1遺伝子カセット及び／またはパッケージングカセットを除去したゲノムを有するヘルパーウイルスを用いることが試みられている。例えば、特許文献4では、ヘルパーウイルスのパッケージングカセット部をloxPで挟んだ構造とし、Cre細胞の酵素でパッケージングカセット部を欠除する方法が提案されている。また、特許文献5には、野生型と相同性の少ないパッケージングカセットを用いる技術が開示されている。このヘルパーウイルスを用いるヘルパーディペンデントベクターは遺伝子治療用に有望と考えられたが、ヘルパーウイルスと導入遺伝子を有するプラスミドとからなる複製はベクターの複製、遺伝子の組み換えが競合するため、収率が低いという欠点があることが分かった。

20

#### 【0006】

アデノウイルスベクターの収率を向上させる方法としては、非特許文献1に記載されているように、コスミドを挿入した全ウイルスゲノムをアデノウイルスDNA-末端蛋白遺伝子を用いて組み換えアデノウイルスを効率よく増殖する方法が開示されている。この文献に開示されている方法は、第一世代のウイルスベクターを増殖する方法に関するものであり、第二世代への応用については何も開示されていない。

#### 【0007】

【特許文献1】特表平10-507928号公報

30

【特許文献2】特表平11-506311号公報

【特許文献3】特表平11-503910号公報

【特許文献4】特表2000-514312号公報

【特許文献5】特表2002-535986号公報

【非特許文献1】SANA E MIYAKE等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 93, pp. 1320-1324, February 1996

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

本発明の目的は、アデノウイルスベクターを高効率で産生する方法を提供することである。

40

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、導入遺伝子カセットを含むベクターDNAと、TPCを有するヘルパーアデノウイルスゲノムとを哺乳動物細胞にコトランスフェクションすることによって、アデノウイルスベクターを高効率で製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

#### 【0010】

すなわち、本発明よれば、(1)パッケージングと増幅に必要なアデノウイルスゲノムと導入遺伝子カセットとからなるベクターDNAと、(2)5'リガンド蛋白質(TPC

50

）、アデノウイルスの5'逆方向末端反復のカセット（ITR）、5' I o x P 部位、切り出し可能なパッケージングシグナルカセット、3' I o x P 部位、E 1 領域の全部もしくは一部が欠失している以外はE 2 領域、E 4 領域及び後期遺伝子を含むアデノウイルスゲノムと、アデノウイルスの3' I T R カセット、3' のT P C とを含むヘルパーアデノウイルスD N A とを、哺乳動物細胞にコトランスフェクションする工程、並びにレスキュー及びプロパゲーションを繰り返して継代培養する工程を含む、アデノウイルスのパッケージングに不可欠なアデノウイルスゲノムとそれに続く導入遺伝子カセットを含むゲノムが内部にパッケージングされてなるカプシド蛋白を含むアデノウイルスベクターの製造方法が提供される。

#### 【0011】

本発明の別の態様によれば、（1）パッケージングと増幅に必要なアデノウイルスゲノムと導入遺伝子カセットとからなるベクターD N A と、（2）5' リガンド蛋白質（T P C ）、アデノウイルスの5' 逆方向末端反復のカセット（I T R ）、パッケージングシグナルカセットとE 1 遺伝子の全部もしくは一部が欠失している以外はE 2 領域、E 4 領域及び後期遺伝子を含むアデノウイルスゲノム、3' I T R とを含むヘルパーアデノウイルスD N A とを、哺乳動物細胞にコトランスフェクションする工程、並びにレスキュー及びプロパゲーションを繰り返して継代培養する工程を含む、アデノウイルスのパッケージングに不可欠なアデノウイルスゲノムとそれに続く導入遺伝子カセットを含むゲノムが内部にパッケージングされてなるカプシド蛋白を含むアデノウイルスベクターの製造方法が提供される。

#### 【0012】

好ましくは、哺乳動物細胞はC r e 2 9 3 である。

好ましくは、導入遺伝子カセットは、筋ジストロフィー治療用遺伝子カセットである。

好ましくは、コトランスフェクションを、リン酸カルシウムを用いる方法またはリポフェクション法により行う。

#### 【発明の効果】

#### 【0013】

本発明により、アデノウイルスベクターを高効率で産生する方法を提供することが可能になった。本発明の方法で製造したアデノウイルスベクターは、遺伝子治療、抗体産生（例えば、ワクチン）、および *in vivo* または *in vitro* での遺伝子制御を試験するための研究などに使用することができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0014】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

従来法および本発明の方法によるアデノウイルスベクターの製造方法の概要を図1に示す。アデノウイルスベクターの製造には、レスキューとプロパゲーションの2つの工程が含まれる。従来法（トランスフェクション及び感染法）は、H D A d v（ヘルパー依存性アデノウイルスベクター）は、ベクターD N A のC r e - 2 9 3 細胞へのトランスフェクション及びそれに続くヘルパーウイルス感染により先ずレスキューされる。次に、レスキューされたH D A d v は、H D A d v とヘルパーウイルスの共感染の繰り返しによりプロパゲーションされる。一方、本発明の方法（コトランスフェクション法）では、H D A d v は、ベクターD N A とヘルパーウイルスD N A - T P C をC r e - 2 9 3 細胞にコトランスフェクションすることによりレスキューされる。レスキューされたH D A d v は従来法と同様にプロパゲーションされる。ヘルパーウイルスD N A が感染又はトランスフェクションにより移入した後、パッケージングシグナル（ $\Psi$ ）はC r e - リコンビナーゼにより除かれる。導入遺伝子（治療遺伝子など）を含むベクターD N A は、ヘルパーウイルスD N A から産生するウイルスキャプシドにパッケージされる。ヘルパーウイルスD N A はパッケージングシグナルが除かれているのでパッケージされない。図1中、ベクターD N A 及びヘルパーウイルスD N A は、黒の長方形及び白の長方形で示す。

#### 【0015】

以下、本発明の構成要素について具体的に説明する。

#### 1. アデノウイルス

アデノウイルスはエンベロープがなく、正20面体(20個の正三角形表面および12個の頂点を有する)であり、約65~80nmの直径である。ファイバーと呼ばれる蛋白が各頂点から突出している。通常には、ファイバー蛋白は3本の同じポリペプチド鎖から構成されているが、その長さはセロタイプによって異なる。アデノウイルスベクターの産生に使用されるアデノウイルス2型および5型が十分に特徴づけられている。本発明で用いるアデノウイルスは任意のアデノウイルスから得ることができる。好ましくは、ヒトアデノウイルス血清型、より好ましくはヒトアデノウイルス血清型1~47、より好ましくはC群血清型(例えば、血清型1、2、5、および6)を使用することができる。好ましくはC群血清型は、ヒトアデノウイルス血清型2または5、より好ましくは血清型5である。

10

【0016】

#### 2. カプシド

アデノウイルスの蛋白コート(カプシド)は252個のサブユニット(カプソマー)から構成され、そのうち240個がヘキソンであり、12個がペントンである。各ペントンはカプシド表面上のペントンベースおよびベースから突出したファイバー蛋白を含む。例えば、Ad2ペントンベース蛋白は、それぞれ571個のアミノ酸からなる5個の同一の蛋白サブユニットから構成される8x9nmの環状複合体であることがわかっている。アデノウイルス蛋白IXはウイルスカプシド表面上にも存在している。

20

【0017】

#### 3. アデノウイルスの遺伝子配列

ヒトアデノウイルスは直鎖状のおよそ36kbの二本鎖DNAゲノムから成る。これは100交差単位(mu)に分けられ、そのそれぞれが長さ360bpである。このDNAはウイルスDNAの複製に必要とされる短い逆方向末端反復(ITR)をゲノムの各末端に含有する。その遺伝子産物は、ウイルスDNA合成の開始前もしくは開始後の発現に基づき、初期(E1からE4)および後期(L1からL5)領域に組織される[例えば、ホルヴィッツ(Horwitz)、ヴァイロロジー(Virology)、第2版、フィールズ(B. N. Fields)編、レイヴアン プレス リミテッド(Raven Press, Ltd.)、ニューヨーク(1990)を参照]。

30

【0018】

#### 4. ベクターDNA

ベクターDNAはパッケージングと増幅に必要なアデノウイルスゲノムと導入遺伝子カセットとから構成されている。ベクターDNAは、アデノウイルスの増幅およびパッケージングに必要なシスエレメントを含むが、アデノウイルスの複製およびパッケージングに必要なトランスエレメントを欠くウイルスベクターをいう。ウイルス産生に必要なシスエレメントは、アデノウイルス3'ITR、パッケージングシグナル、およびアデノウイルス5'ITRである。ウイルス産生に必要なトランスエレメントはE1、E2、およびE4、ならびにLアデノウイルス領域によってコードされるタンパク質である。好ましくは、ベクターDNAは、アデノウイルスタンパク質をコードする核酸を欠いている。本発明では、ベクターDNAは、in vivoでの細胞への遺伝子送達用のベクターとして使用される。ベクターDNAの産生および単離を容易にするのに有用なヘルパーウイルスエレメントには、相同性の低い切り出し可能なパッケージングシグナルおよび置換E3領域が含まれる。

40

【0019】

#### 5. ヘルパーウアデノウイルス

「ヘルパーアデノウイルス」は、ベクターDNAのウイルス産生に必要な1つまたは複数のタンパク質を発現するウイルスをいう。好ましくは、ヘルパーアデノウイルスはアデノウイルス3'ITR、アデノウイルスパッケージングシグナル、アデノウイルス5'ITRを含み、アデノウイルスE2およびE4ならびにL領域のタンパク質をコードする。ヘルパーウイルスによって得られないトランスエレメントは、細胞などの他の手段によって得

50

ることができる。例えば、293細胞をこのようなタンパク質を発現しないヘルパーウイルスと共に使用して、トランスで必要なE1タンパク質を供給することができる。

【0020】

#### 6. ITR

ITRとは逆方向末端反復のことであり、この配列は5' ITR (アデノウイルスゲノムの塩基対1-103) ; およびパッケージング/エンハンサードメイン (アデノウイルスゲノムの塩基対194-358) を包含する。本発明で使用したベクターDNAには、アデノウイルスゲノムの塩基対194-455までを含めていて、全てのパッケージング/エンハンサードメインを含んでいる。

【0021】

#### 7. パッケージングシグナル

例えば、アデノウイルス血清型5の野生型パッケージングシグナルは、ゲノムのnt 230とnt 380との間に存在するA反復と呼ばれる少なくとも7個の機能的単位によって形成される。Aエレメントは、コンセンサス配列TTTGN8CGを有する (Schmid et al, 1997, J.Virol., 71, 3375-3384)。

【0022】

リコンビナーゼ認識配列は、その配列を認識するリコンビナーゼに基づいて作用する場合に組換えられて核酸が切り出され、核酸の介在が繰り返される。認識配列は、組換えられる核酸セグメントが適切に位置付けられるように十分に離れて (少なくとも約180bp) いなければならない。好ましくは、リコンビナーゼ認識配列は、loxPまたはfrtである。

【0023】

loxP認識部位は、Creリコンビナーゼによる切り出しを可能にするパッケージングシグナルの3'および5'に存在し得る。Creリコンビナーゼを安定に発現する293cre細胞などの細胞は、loxP認識部位の間に存在する核酸を効率的に除去することができる。 (Parks, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93, 13565-13570, 1996およびPark s, et al, J.Virology, 71, 4, 3293-3298, 1997)。本発明では、Cre-293細胞 (Virology, 309 (2003) 330-338, Cre/loxP-mediated adenovirus type5 packaging signal excision demonstrates that core element VI is sufficient for virus packagingに記載) を使用することができる。パッケージングシグナルに隣接する第1のloxP部位がパッケージングシグナル内で相同組換えによって取り除かれる。

【0024】

例えば、パッケージングシグナルに隣接する第1のloxP部位がパッケージングシグナル内で相同組換えによって取り除かれる場合Creリコンビナーゼがもはやパッケージングシグナルを切り出すことができないので、得られたヘルパーウイルスは293cre中での選択を回避する。

【0025】

#### 8. 導入遺伝子

本発明において、アデノウイルスにより送達されて発現される導入遺伝子としては、例えば、酵素、血液誘導体、ホルモン、インターロイキンおよびインターフェロン等のリンホカイン、凝固因子、成長因子、神経伝達物質、腫瘍サプレッサー、アポリポ蛋白、抗原又は抗体、ならびに他の生物学的に活性のある蛋白をコードする遺伝子を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。導入遺伝子の具体例としては、濃胞性繊維症膜貫通レギュレーター (CFTR)、ジストロフィン、グルコセレブロシダーゼ、腫瘍壊死因子p53、p21、単純ヘルペスチミジンキナーゼおよびガンシクロビル、網膜芽細胞腫 (Rb)、およびアデノシンデアミナーゼ (ADA)、シトシンデアミナーゼ、エリスロポイエチン、オルニチントランスカルバミラーゼ、インターロイキン-2、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、スロンボポイエチン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。アンチセンス分子またはリボザイムをコードする導入遺伝子を使用することもできる。ベクターDNAには、1またはそれ以上の調節エレメントの制御下にある1またはそれ

10

20

30

40

50



以上の導入遺伝子が含まれていてもよい。

【0026】

#### 9. T P C

T P C は、アデノウイルスゲノムの複製、救済(rescue)および組み込みに関与する。

【0027】

#### 10. 宿主細胞

宿主細胞の具体例としては、293細胞、911細胞、およびPERC. 6細胞(国際公開WO97/00326号公報)、A549細胞を、HER3細胞(Ad12により形質転換されたヒト胚網膜芽細胞)、またはvK-20細胞などが挙げられる。適当な細胞を構築して、ウイルスタンパク質またはリコンビナーゼなどの有用なタンパク質を得ることができる。好ましくは、相補性ヒト胎児腎(HEK)293細胞株(トランスに作用するE1aタンパク質を提供する機能的アデノウイルスE1a遺伝子を含むヒト腎細胞株)を使用することができる。

10

【0028】

#### 11. アデノウイルス遺伝子の入手

タイプAd5を包含する多数のアデノウイルスはGenbankより入手可能である。アデノウイルスの配列としては、同定されている41種のヒト型のものを使用してもよいし、他の動物に感染することが知られているアデノウイルスを使用してもよい。アデノウイルス株はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)、(ロックヴィル、メリーランド)より入手することもできるし、他の市販品を使用したり、他の研究施設等の供給源から入手することもできる。

20

【0029】

#### 12. ベクターDNA及びヘルパーアデノウイルスの調製

ベクターDNA及びヘルパーアデノウイルスゲノムの調製は、当該分野で周知の技術(例えば、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley、1987-1988およびSambrook, et al., Molecular Cloning, A laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989に記載の技術など)を用いて、本明細書の実施例に記載の方法又はそれに準じた方法により行うことができる。

【0030】

#### 13. コトランスフェクション

本発明では、ベクターDNAと、T P Cを有するヘルパーアデノウイルスゲノムとを、哺乳動物細胞にコトランスフェクションする。コトランスフェクションは、リン酸カルシウムを用いる方法またはリポフェクション法により行うことができる。

30

【0031】

#### 14. レスキュー及びプロパゲーション

cytopathic effect (CPE)が現れた後に、細胞を回収し、凍結-融解し、ついで、塩化セシウム遠心分離を用いて精製することによりウイルスを回収することができる。別法として、クロマトグラフィー法、例えば、P C T / U S 9 6 / 1 3 8 7 2 に示された方法を用いてウイルス精製を行うこともできる。

【0032】

40

#### 15. 遺伝子/蛋白(カプシド)複合体

レスキューされたアデノウイルスゲノムは予め形成されたタンパク質キャプシド内にパッケージングされ、そして細胞分解の後、アデノウイルスDNAゲノムをパッケージングした感染性ビリオンとして放出される。本発明の方法で製造したアデノウイルスベクターは複製欠陥したものであり、すなわち、宿主細胞中で生産的な感染を生じさせることができないものである。

【0033】

#### 16. 力価の測定

本発明の方法で製造したアデノウイルスベクターの力価は、ベクターの持つマーカ等で測定することができる。例えば、マーカ遺伝子LacZを入れている場合には、レスキ

50

ー／プロパゲーションした細胞を壊して、その一部をC0S7細胞に感染させてlacZ染色して青い細胞をカウントすることにより力価を測定することができる。アデノウイルスのヘキソン蛋白に対する抗体を用いる終点希釈を使用してウイルス産生または標的細胞に対する感染効率を定量してもよい。

【0034】

#### 17. 導入遺伝子の発現

本発明の方法で製造したアデノウイルスベクターが、マーカーまたは他の導入遺伝子をコードしている場合、遺伝子発現を調べるアッセイとしては、例えばノーザンブロット、S1分析または逆転写ーポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)による導入遺伝子のmRNAの測定などが挙げられる。導入遺伝子によりコードされる蛋白の存在を、ウェスタンブロット、免疫沈降、免疫細胞化学、または当業者に既知の他の方法により検出してもよい。

【0035】

#### 18. デリバリー用組成物

本発明の方法で製造したアデノウイルスベクターは、カチオン性両親媒性物質を用いて複合体を形成させてもよい。カチオン性両親媒性物質の具体例としては、DOTMA (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417, 1987); (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド); DOGS (ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン) (Behr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986, 1989); DMR1E (1,2-ジミロスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド) (Felgner et al., J. Biol. Chem. 269: 2550-2561, 1994); ならびにCD-chol (3B[N-N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール) (米国特許第5,283,185号)等のカチオン性脂質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0036】

また、アデノウイルスベクターを含む組成物中に、1種またはそれ以上のカチオン性両親媒性物質を中性共存脂質(ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)のごとき)とともに処方して細胞中へのベクターのデリバリーを容易ならしめてもよい。これらの複合体に使用してもよい他の共存脂質の具体例としては、ジフィタノイルホスファチジルエタノールアミン、lys-o-ホスファチジルエタノールアミン、他のホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、lys-o-ホスファチジルコリンおよびコレステロールなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0037】

#### 19. 投与方法

本発明の方法で製造したアデノウイルスベクターを遺伝子治療のために使用する場合、その標的部位は特に限定されないが、例えば、ニューロン、肝細胞、上皮細胞などを標的とすることができる。本発明の方法で製造したアデノウイルスベクターの投与経路は、標的の器官、組織又は部位へ直接的に投与してもよいし、あるいは鼻内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経口および他の非経口の投与経路でもよい。所望により、2以上の投与経路を組み合わせることもできる。

【0038】

#### 20. 投与量

アデノウイルスベクターを伴ったカチオン性両親媒性物質を含有する複合体の処方において、 $10^7 \sim 10^{10}$ の好ましい範囲の感染単位のウイルスを、ウイルス粒子1個あたり $10^4 \sim 10^6$ 個の範囲のカチオン性両親媒性物質と混合することができる。本発明の方法で製造したアデノウイルスベクターの治療上有効なヒトの用量としては、例えば、約 $1 \times 10^7$ から $1 \times 10^{10}$ bfu/ml (bfuはblue forming unitを示す)のアデノウイルスベクター濃度を含有する生理的食塩水溶液を約20mlから約50ml程度投与することができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

10

20

30

40

50

## 【実施例】

## 【0039】

## 実施例1：ヘルパーウイルス作製

42KbのコスミドpAdex1cw（東京大学医科学研究所 斉藤泉博士より譲渡）を制限酵素SalIにて切断、セルフ・ライゲーションにてアデノウイルスの左端部分を含んでいる4.2KbのpAdexSal1selfを作製した。ウイルス左端よりnucleotide 143番目（nt143）の制限酵素AflIII認識サイトとnt 454の制限酵素ClaI認識サイトに、各々のサイトにライゲーションされるリンカーを持つ合成オリゴloxP配列を挿入した。この操作にてできたプラスミドをpAdex-ASw-lox-salと名付けた。このプラスミドから2個のloxPサイトを持つアデノウイルスの左端部分を、制限酵素EcoRIとSwaIの消化にて回収した。このフラグメントとpAdex1cwのEcoRIとSwaIの消化で生じる24Kbのアデノウイルスの一部のフラグメントをEcoRIで切断したpAdex1cwにライゲーションさせコスミドpAdex-ASw-loxを作った。これにより、pAdex1cwのアデノウイルス左端でパッケージングシグナルを挟み込む部分にloxPを挿入した。

10

## 【0040】

更に、ヘルパーウイルスをマーキングする目的とヘルパーウイルスゲノムをできるだけ大きくして、HDAAdvの密度差を大きくする目的で、以下の操作をした。ヘルパーウイルスゲノムを大きくする為に、λファージの3.7KbBspHIフラグメント（λファージのnt 890-nt 4650）をpGL3-Control（Promega）のHindIIIサイトにプラントライゲーションした。このプラスミドより、luciferase 発現カセットと3.7Kbλフラグメントを含む6.2 Kb DNAフラグメントを制限酵素MluIと制限酵素SalIの消化にて回収した。このフラグメントをコスミドpAdex-ASw-loxのSwaIサイトにプラント・ライゲーションした。これにてコスミドpAdex-ASw-lox-lucλを作製した。

20

## 【0041】

EcoT22Iにて左端を消化し、右端にterminal proteinを共有結合したアデノウイルスゲノム0.5μgと上のコスミドpAdex-ASw-lox-lucλ 14.5μgをHEK293細胞にco-transfectionしてウイルスを作製した。

## 【0042】

## 実施例2：Cre-293細胞の樹立

CreはAxCANCre（TaKaRa Biomedicals）よりPCRを用いて核移行シグナルを除いて増幅した。それをpCI-neo（Promega）のSmaIサイトにプラント・ライゲーションして、できたプラスミドをpCI-neo-Creとした。このプラスミドをBglIIIにて線状化させ、それをHEK293細胞に導入した。その後400μg/mlのG418（Sigma）を含むDMEM/10% FBSにて維持し、生じたコロニーをピック・アップして更に選択培地で増殖させた。

30

なお、上記実施例1及び実施例2の内容は、virology, 309(2003)330-338, Cre/loxP-mediated adenovirus type5 packaging signal excision demonstrates that core element VI is sufficient for virus packagingに記載されている。

## 【0043】

## 実施例3：ベクターDNAの作製

pBluescript KS+（STRATAGENE）をKpnIとPstIで消化し、断端をランティングしてセルフ・ライゲーションした。更にSacIとBamHIで消化し、断端をランティングしてこちらもセルフ・ライゲーションして不要なマルチプル・クローニング・サイトを無くした。残ったSmaIサイトにPacI-NotI-KpnI-SwaI-SpeI-PmeI-XhoI-NotI-PacI合成オリゴを挿入した。このプラスミドをpPNKSSPXNPとした。

40

## 【0044】

ITR+パッケージングシグナルφは前出のpAdexSal1selfをBamHIとSwaIで消化して回収した。これをXhoIサイトに挿入した。ITRはやはりpAdexSal1selfをBamHIとBsrGIで消化して回収し、これをKpnIサイトに挿入した。スタッファーDNAとしてマウスEmx2 gene K2 クローン（相沢博士より譲渡）pEmx2K2を使用した。pEmx2K2のSpeI/SwaIフラグメント（2.6Kb）をSwaIとSpeIの間に挿入した。これをpPN2.6NPとした。更に7.4KbSpeIフラグメントをpPN2.6NPのSpeIサイトに挿入しpPN10NPとした。

50

## 【0045】

マーカーとしてRSVプロモーターより発現するlacZ遺伝子を用いた。先ずpRc/RSV (Invitrogen) をSpeIとXbaIで消化し、プランティングの後セルフ・ライゲーションを行ないクローニングサイトとしてHindIIIのみを残し、不要なサイトを無くした。残ったHindIIIサイトにLacZ遺伝子を挿入した。この発現プラスミドをNruIとNaeIで消化しRSVプロモーター下で動くLacZ発現ユニットを回収した。これを先程のpPN10NPのSwaIサイトに挿入し、pPN10LacZとした。

## 【0046】

Dystrophin cDNAをcytomegaro virus early gene enhancerとchicken  $\beta$ -actin promoter(CAG promoter)にて発現させるdystrophin発現ユニットを更に挿入した。先ず、pBlue scriptKS+をXbaIとEcoRVにて消化、プランティング後セルフライゲーションした。次ぎにpCAGGS (宮崎純一博士、山村研一博士より譲渡)よりSalIとHindIIIの消化にてエンハンサー／プロモーター／ $\beta$ -グロビンのポリAシグナルを取り出し、先程のプラスミドのSalIとHindIIIに挿入しpBluescript CAGとした。このEcoRIサイトに、pCCL-DMDよりNotIにて回収したマウス完全長dystrophin cDNA(Dr.Cremens より譲渡)を挿入した。これからdystrophin 発現ユニットをSalIとNotIの消化で回収し、pPN10LacZのPmeIサイトに挿入した。これにてpRSVLacZ-dysを作製した。

HDAdv作製するにあたり、RSVLacZ-dysをNotIで切りtransfectionに用いた。

## 【0047】

実施例4：TPC結合型ヘルパーアデノウイルスDNAの回収

TPC結合型ヘルパーアデノウイルスDNAの回収は、Miyake, PNAS Vol93 pp.1320-1324 Feb.1996, Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length genomeに記載の方法に従って下記の通り行った。

HEK293細胞にてブランク精製したヘルパーウイルスを、 $10^7$ 個のHEK293細胞に感染させ、約1週後に全ての細胞でcytopathic effect(CPE)が確認された後、培養上澄みと細胞を回収。凍結融解を行ないウイルス粒子を細胞より放出させ、それを $10^8$ 個のHEK293に感染させ前と同様に増幅してゆく。次ぎに $5 \times 10^9$ 個のHEK293細胞に感染させCPEを起こさせ細胞のみを遠心にて回収する。それを0.1M Tris bufferに懸濁させ1/10 vol 5% sodium deoxycholateを加え、細胞を破碎する。3.1ml のウイルス懸濁液に対して1.8mlのCsCl飽和TEを加えBeckman Sw50.1 Rotorにて35,000 rpm over night 遠心にてウイルスを密度勾配にて精製する。遠心後ウイルスバンドを回収しもう一度同様の条件にて密度勾配精製し、ウイルスバンドを回収し精製ウイルス液とする。

## 【0048】

この精製ウイルス液に等量の8M塩酸グアニジンを加え、更にBeckman NVT65 rotor 専用遠心チューブに一杯になるように50gCsCl/50ml 4M塩酸グアニジン液を詰め55,000 rpmにてover night遠心する。密度勾配が出来た後、fractionationして分取する。各フラクションの一部にエチジウム・ブロマイドを加えUV照射してDNAフラクションを確認する。

DNAを含むフラクションをまとめて、TEにて透析する。透析後、一部を用いOD260を測定して通常のDNAと同様に濃度を算出し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存する。

## 【0049】

実施例5：HDAdvのレスキュー法

NotIで切断した14 $\mu\text{g}$  のvector DNAと1 $\mu\text{g}$  のhelper virus DNA-TPCを、60mm細胞培養ディッシュのCre-293にリン酸カルシウム法でコトランスフェクションする。Over night でトランスフェクション後、PBS(-)で結晶を洗い新しい培地にて培養を継続する。約4日で多くの細胞はCPEを起こす。この時点で培地と細胞を全て回収し、3回凍結／融解を行ない、細胞を破碎する。

## 【0050】

35mm細胞培養ディッシュのCOS7細胞に、HDAdvを含む培地の1/20を用いて感染させる。2日後に細胞をX-gal染色する。結果を顕微鏡にて取り込み肉眼的にLacZ陽性細胞を数え、H

10

20

30

40

50

DAdvの数を計算してHDAAdvの力価とし、Blue forming unit (BFU)として表現した。

【0051】

実施例6：HDAAdvのプロパゲーション

プロパゲーションにあたり、各々のレスキュー/プロパゲーションが済む毎に一部を用いCOS7細胞に2日間感染させX-gal染色でHDAAdvの力価を決め、それと同数のCre-293を準備し次ぎのプロパゲーションに用いた。則ちプロパゲーションにおいては1個のCre-293細胞に1-2BFUのHDAAdvを約2時間感染させ、その後、ヘルパー Aswをmoi3-5で感染させた。培養を継続し約2-3日で全ての細胞でCPEを確認できた時点で培地、細胞を回収した。それを3回の凍結/融解し細胞を破碎した。

【0052】

実施例5と実施例6の測定結果を図2及び図3に示す。図2の(A)は、ベクターDNAの構造を示す。ベクターDNAは、CAGプロモーター/エンハンサーの制御下にあるマウス全長ジストロフィンcDNA、RSVプロモーター/エンハンサーにより駆動する細菌β-ガラクトシダーゼORF、マウスEmx-2遺伝子の一部(スタッファーDNA)、アデノウイルス5型パッケージングシグナル(Ψ)、及び2つのITRを含む。図2の(B)では、培養上清及び細胞ライセートの1/20を使用して、6穴カルチャープレート中でCOS7細胞上でHDAAdvの定量を行った。細胞を2日間感染させた後、X-gal染色を行った。偶数番号では外来のCre発現プラスミドをベクターDNAと一緒にトランスフェクションしたが、奇数番号ではトランスフェクションしなかった。図2(C)は、各レスキュー条件下でのHDAAdv LacZ-dysの生産量を示す。番号は図2(B)に対応する。

【0053】

図3は、一連のプロパゲーションによるHDAAdvの増幅を示す。

白丸：本発明の方法であるヘルパーウイルスDNA-TPCコトランスフェクション法によりレスキューしたHDAAdvを、Cre-293細胞にHDAAdv及びヘルパーウイルスを連続的に共感染させることにより増幅させた。

黒菱形：従来法であるトランスフェクション及び感染法によりレスキューしたHDAAdvを増幅させた。

各プロパゲーションにおける感染Cre-293の数はHDAAdvの生産量が増加するにつれて段階的に増大した。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】図1は、従来法および本発明の方法によるアデノウイルスベクターの製造方法の概要を示す。

【図2】図2は、各条件におけるヘルパー依存性アデノウイルスベクターのレスキュー効率を示す。

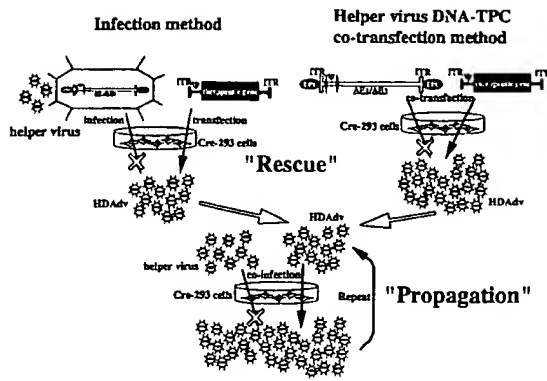
【図3】図3は、一連のプロパゲーションによるHDAAdvの増幅を示す。

10

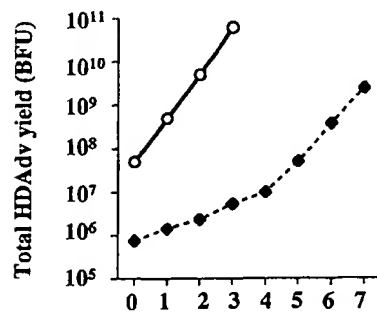
20

30

【 図 1 】



【 図 3 】



【 2 】

